

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Denisa Folprechtová

STANOVENÍ ESTERŮ TESTOSTERONU V INJEKČNÍ LÉKOVÉ FORMĚ METODOU HPLC-DAD

Determination of testosterone esters in injectable dosage
form by HPLC-DAD

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: RNDr. Petr Kozlík, Ph.D.

Praha 2016

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 10. května 2016.

Abstrakt

Anabolické steroidy jsou v současné době velmi kontroverzním tématem nejen pro své terapeutické využití, ale především z důvodu nezákonného zneužívání ve sportovním odvětví. Cílem této bakalářské práce byl vývoj rychlé, selektivní, účinné a jednoduché metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie vhodné ke stanovení vybraných anabolických steroidů v injekční lékové formě. Analyzovaný vzorek farmaceutického přípravku Sustamed obsahoval čtyři estery testosteronu - testosteron propionát, testosteron fenylpropionát, testosteron isokaproát a testosteron dekanoát. Optimalizované HPLC-DAD podmínky vhodné ke stanovení vybraných esterů testosteronu byly následující: povrchově porézní kolona Poroshell HPH-C18 ($3,0 \times 100$ mm, $2,7 \mu\text{m}$), mobilní fáze složená z 10mmol/l roztoku octanu amonného o pH 4,5 a acetonitrilu za gradientové eluce. Kolona byla temperována na 50°C , objem nástřiku byl $1 \mu\text{l}$, průtok byl nastaven na 1 ml/min a detekce probíhala při 240 nm. Celková doba analýzy byla 6 minut.

Klíčová slova

anabolické steroidy, estery testosteronu, HPLC-DAD

Abstract

Anabolic steroids are currently very controversial issue not only for its therapeutic use but especially because of the illegal abuse in the sport branch. The aim of this thesis was to develop a rapid, selective, effective and simple method of high performance liquid chromatography suitable for the determination of anabolic steroids in injectable dosage form. The analyzed sample of pharmaceutical product Sustamed contained four testosterone esters: testosterone propionate, testosterone phenylpropionate, testosterone isocaproate and testosterone decanoate. Optimized HPLC-DAD conditions suitable for determination of the selected testosterone esters were as follows: core-shell column Poroshell HPH-C18 (3.0 x 100 mm, 2.7 mm), mobile phase consisted of 10mmol/l ammonium acetate, pH 4.5 and acetonitrile, gradient elution was used. The column was thermostated at 50 °C, injection volume was 1 µl, flow rate was set at 1ml/min and UV detection at 240 nm. Total analysis time was 6 minutes.

Key words

anabolic steroids, testosterone esters, HPLC-DAD

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli RNDr. Petru Kozlíkovi, Ph.D za pomoc při řešení mé bakalářské práce, především za ochotu, trpělivost, cenné rady a čas, který mi poskytl.

Dále bych chtěla poděkovat i celé své rodině, která mě podporovala během celého mého studia.

OBSAH

1	ÚVOD.....	- 9 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 10 -
2.1	Anabolické steroidy	- 10 -
2.1.1	Historie a současnost anabolických steroidů	- 10 -
2.1.2	Testosteron	- 11 -
2.1.3	Deriváty testosteronu	- 12 -
2.1.4	Struktura a vlastnosti esterů testosteronu	- 12 -
2.2	Metody využívané ke stanovení anabolických steroidů	- 14 -
2.3	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie	- 19 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 20 -
3.1	Chemikálie	- 20 -
3.2	Přístroje	- 22 -
3.3	Programy	- 22 -
3.4	Příprava vzorků	- 22 -
3.5	Příprava kalibračních roztoků	- 23 -
3.6	Příprava pufru	- 23 -
3.7	Optimalizace separace esterů testosteronu	- 23 -
3.8	Mez detekce a mez stanovitelnosti	- 24 -
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	- 25 -
4.1	Optimalizace separačních podmínek	- 25 -
4.2	Kalibrační závislosti, mez detekce a mez stanovení	- 30 -
4.3	Stanovení anabolických steroidů v přípravku Sustamed	- 32 -
5	ZÁVĚR	- 36 -
6	POUŽITÁ LITERATURA	- 37 -

SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

°C	stupeň Celsiův, jednotka teploty
AU, mAU	relativní jednotka prošlého světla (z anglického arbitrary unit)
C8	oktylová stacionární fáze
C18	oktadecylová stacionární fáze
DAD	detektor diodového pole
DHT	Dihydrotestosteron
EMA	Evropská léková agentura (z anglického European Medicines Agency)
<i>F</i>	šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky
GC	plynová chromatografie
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
<i>K</i>	retenční faktor
<i>λ</i>	vlnová délka
LOD	mez detekce
LOQ	mez kvantifikace
MS	hmotnostní spektrometrie
MS/MS	tandemová hmotnostní spektrometrie
<i>N</i>	počet teoretických pater
NP	normální fáze
<i>P</i>	rozdělovací koeficient
<i>R_{i,j}</i>	rozlišení dvou píků
<i>R</i> ²	korelační koeficient
RP	obrácená fáze
SD	směrodatná odchylka
SHBG	sexuální hormon vážící globulin nebo albumin
<i>T</i>	tailling faktor, vypovídá o symetrii píku
TD	testosteron dekanoát
TI	testosteron isokaproát
TLC	tenkovrstvá chromatografie
<i>t_M</i>	mrtvý čas kolony

TP	testosteron propionát
TPh	testosteron fenylpropionát
$t_{R,i}$	retenční čas daného analytu
UHPLC	ultra vysokoúčinná kapalinová chromatografie
UV	ultrafialová oblast
v/v	objemový poměr
$w_{0,05}$	šířka píku při 5 % jeho výšky
w_i	šířka píku při základně

1 ÚVOD

Anabolické steroidy jsou látky, které jsou lékaři využívány již několik let k léčbě různých typů onemocnění. Často jsou podávány pacientům po operacích nebo po dlouhodobé hospitalizaci, kteří trpí celkovým oslabením organismu nebo těžkými stavy podvýživy, za účelem nárůstu svalové hmoty. Spíše než pro své terapeutické využití jsou anabolické steroidy spojovány převážně s dopingem ve sportu, zejména v oblasti kulturistiky. Ačkoliv jsou tyto látky podávány pouze na doporučení lékaře, jsou běžně k dostání i bez lékařského předpisu prostřednictvím internetových obchodů. Zde hrozí riziko, že složení zakoupeného farmaceutického přípravku neodpovídá uvedenému složení na obalu.

Anabolické steroidy jsou nejčastěji stanovovány jednak v krevním séru či plasmě, moči nebo v srsti zvířat, ale také i v nejrůznějších lékových formách jako tablety nebo injekční roztoky. Mezi nejběžnější způsoby stanovení těchto látek patří vysokoúčinná chromatografie (HPLC), ultra-vysoká kapalinová chromatografie (UHPLC) nebo plynová chromatografie (GC).

Cílem této bakalářské práce bylo vyvinout a optimalizovat vhodnou metodu pro stanovení anabolických steroidů v injekční lékové formě farmaceutického přípravku Sustamed pomocí HPLC s detektorem diodového pole.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Anabolické steroidy

Anabolické steroidy jsou v literatuře definovány několika způsoby, nejčastěji jako syntetické deriváty testosteronu [1, 2]. Dále mohou být popisovány jako skupina uměle vytvořených steroidů, které jsou strukturně podobné mužským pohlavním hormonům – androgenům – a u kterých je zvýšen jejich anabolický účinek a zároveň potlačen androgenní účinek [3]. Jak již bylo zmíněno, anabolické steroidy mají jednak anabolický účinek, podílí se na růstu svalové hmoty a kostní tkáně, ale současně mají i androgenní účinek, zodpovědný za vývoj a funkci mužských pohlavních orgánů a rozvoj mužských sekundárních pohlavních znaků. Přesněji jsou označovány jako anabolické androgenní steroidy [4].

2.1.1 Historie a současnost anabolických steroidů

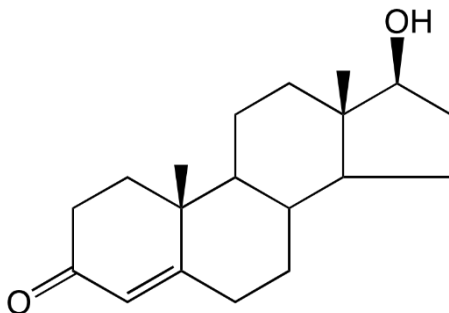
Testosteron byl izolován v polovině 30. let 20. století a téhož roku byla určena jeho struktura, za což byla v roce 1939 udělena Nobelova cena za chemii L. Ružičkovi a A. Butenandtovi [5]. Zpočátku byly tyto látky, testosteron a jeho syntetické deriváty, využívány hlavně k léčbě nejrozličnějších onemocnění jako nedostatečné tvorby testosteronu u mužů, karcinomy prsu nebo při léčbě kardiovaskulárních onemocnění [6]. Během 50. let 20. století začaly být zneužívány vrcholovými sportovci ke zlepšení jejich fyzické kondice. V roce 1975 bylo užívání anabolických steroidů zakázáno Mezinárodním olympijským výborem [7].

Anabolické steroidy dnes hrají poměrně významnou roli v kulturistice (bodybuildingu) a to jak na amatérské, tak profesionální úrovni. Při zneužívání anabolických steroidů jsou dávky často několikanásobně větší, než jsou předepisovány v rámci léčby, což může mít dopad na lidské zdraví. Důsledky zneužívání anabolických steroidů souvisí s pohlavím, věkem, množstvím a dobou užívání [8]. U mužů se jedná o sníženou tvorbu spermií, zvětšení mléčné žlázy (gynekomastie) a zvýšené riziko rakoviny prostaty. U žen může docházet k projevům mužských pohlavních znaků (maskulinizaci). Pokud jsou anabolické steroidy užívány adolescentem, mohou způsobit zastavení jeho růstu. Jak u mužů, tak u žen zvyšují hladinu cholesterolu v krvi, což může vyústit v infarkt myokardu či cévní mozkovou příhodu [9]. Kromě některých výše

uvedených zdravotních komplikací je pravidelné užívání anabolických steroidů doprovázeno také změnami chování jedince. Příznakem bývá narůstající agresivita [10].

2.1.2 Testosteron

Testosteron patří do skupiny androgenů neboli mužských pohlavních hormonů, který je u mužů produkován především Leydigovými buňkami ve varlatech, ale vyskytuje se v malém množství i u žen [11]. Je syntetizován z cholesterolu. Prvním důležitým meziproduktem biosyntézy testosteronu je pregnenolon, který je tvořen z cholesterolu dvěma hydroxylacemi a oxidativním štěpením postranního řetězce. Následuje další důležitý meziprodukt, jímž je progesteron. Ten je vytvořen po dehydrataci hydroxylové skupiny na uhlíku C-3 a po přemístění dvojné vazby z uhlíku C-5 na uhlík C-4. Při syntéze testosteronu z progesteronu dochází k úplnému oxidativnímu odstranění postranního řetězce. Tvorba testosteronu ve varlatech je stimulována luteotropním hormonem [12]. V přítomnosti 5 α - reduktasy je testosteron metabolizován na dihydrotestosteron (DHT), pomocí aromatasy se přeměňuje na estrogeny. V krvi se testosteron a DHT vyskytují buď volně nebo vázané na proteiny (SHBG - sexuální hormon vážící globulin nebo albumin) [5]. Základní struktura testosteronu je zobrazena na obr. 2 [13].



Obr. 1: Strukturní vzorec testosteronu.

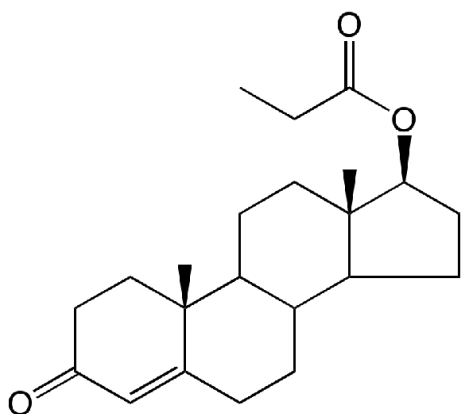
2.1.3 Deriváty testosteronu

Molekula testosteronu může být strukturně modifikována za účelem zvýšení své biologické dostupnosti v organismu. Změna chemické struktury má vliv na poměr anabolických a androgenních vlastností molekuly, ale souvisí také se způsobem podání. Orální podání testosteronu (ve formě tablet či kapslí) není příliš účinné vzhledem k efektu prvního průchodu játry, kdy je většina metabolizována v játrech a vyloučena močí. Z toho důvodu může být na uhlík v pozici 17 - α zavedena alkylová skupina, čímž se sníží odbourávání v játrech, nebo je v pozici 17 - β esterifikován [1].

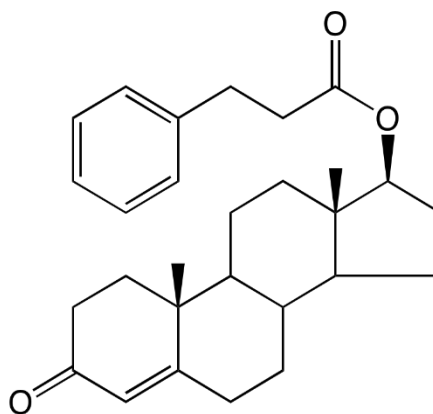
Estery testosteronu jsou nejčastěji aplikovány v olejovém roztoku intramuskulárně (injekčně do svalu). Délka účinku těchto látek závisí na tom, jak ochotně se uvolňují z olejové báze. Estery s delším postranním řetězcem jsou uvolňovány pomaleji, čímž se zvyšuje i délka jejich účinku [5]. Další lékové formy anabolických steroidů jsou dostupné jako gely, krémy či náplasti [14].

2.1.4 Struktura a vlastnosti esterů testosteronu

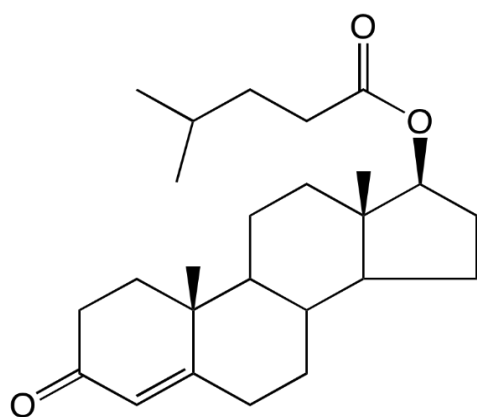
Tato práce je zaměřena na čtyři estery testosteronu: testosteron propionát [15] (obr. 2), testosteron fenylpropionát [16] (obr. 3), testosteron isokaproát [17] (obr. 4) a testosteron dekanoát [18] (obr. 5), jejichž základní fyzikálně-chemické vlastnosti jsou uvedeny v tabulce č. 1.



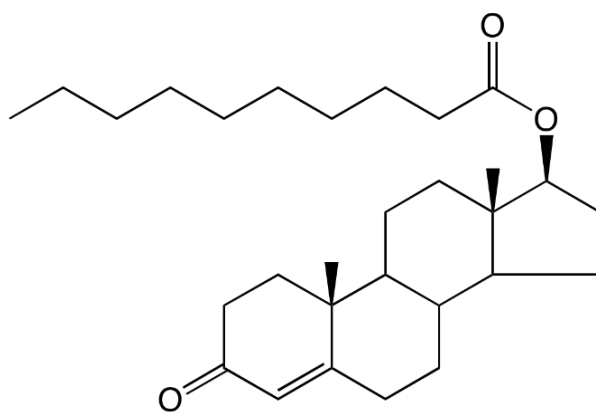
Obr. 2: Strukturní vzorec testosteron propionátu.



Obr. 3: Strukturní vzorec testosteron fenylpropionátu.



Obr. 4: Strukturní vzorec testosteron isokaproátu.



Obr. 5: Strukturní vzorec testosteron dekanoátu.

Tab. 1: Základní fyzikálně-chemické vlastnosti zkoumaných látek

Látka	Molekulový vzorec	Relativní hmotnost	$\log P$	Bod varu [°C]
testosteron propionát [19]	$C_{22}H_{32}O_3$	344	4,90	455
testosteron fenylpropionát [20]	$C_{28}H_{36}O_3$	421	6,45	547
testosteron isokaproát [21]	$C_{25}H_{38}O_3$	387	6,31	488
testosteron dekanoát [22]	$C_{29}H_{46}O_3$	443	8,62	539

2.2 Metody využívané ke stanovení anabolických steroidů

Anabolické steroidy jsou nejčastěji stanovovány metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) s hmotnostní detekcí (MS) nebo UV detekcí. Další metodou vhodnou ke stanovení anabolických steroidů je UHPLC s tandemovou hmotností spektrometrií (MS/MS) [23, 24], jejíž hlavní výhodou je schopnost současného stanovení širokého spektra anabolických steroidů ve velmi krátkém čase. Jiné metody stanovení jsou TLC [25] či GC s tandemovou hmotnostní spektrometrií [26], které jsou v porovnání s HPLC prováděny v menší míře. Anabolické steroidy jsou ve většině případů stanovovány v biologických matricích, převážně v krevním séru či plasmě, moči nebo v srsti zvířat [27–32]. Olejové roztoky jsou pro HPLC systém složitou matricí, a proto se také stanovení anabolických steroidů ve vzorcích na olejové bázi v literatuře příliš neobjevovala.

Vzorky je nutno před samotnou analýzou přechistit a zakoncentrovat, nejvíce využívaná technika úpravy vzorků z biologických matric je extrakce tuhou fází a extrakce kapaliny kapalinou. K separaci anabolických steroidů byla použita HPLC na reverzních fázích, přičemž nejpoužívanější stacionární fází byla oktadecylová (C_{18}) a oktylová (C_8) stacionární fáze. Jako mobilní fáze byla často použita směs acetonitrilu a vody [27, 29] nebo směs methanolu s určitým pufrům jako vodnou složkou [28]. Ve většině analýz bylo stanovováno současně několik analytů, z toho důvodu byla častěji aplikována gradientová eluce. V tabulce č. 2 jsou uvedeny příklady stanovení anabolických steroidů v biologických vzorcích. Přehled následujících stanovení je zaměřen na testosteron a čtyři zkoumané estery: propionát (TP), fenylpropionát (TPh), isokaproát (TI) a dekanoát (TD).

Tab. 2: Přehled vybraných stanovení anabolických steroidů v biologických matricích

Typ vzorku	Analyt	Stacionární fáze – kolona	Mobilní fáze	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Detekce
krevní sérum	testosteron a jiné [27]	Hypersil BDS RP-C ₁₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ CN/H ₂ O (35/65 v/v)	0,4	1,1	UV (234 nm)
lidská moč	testosteron a jiné [28]	Chromolith RP – 18e	HCOONH ₄ /CH ₃ OH (35/65 v/v)	0,27	-	MS
lidská moč	testosteron a jiné [29]	Hypersil ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ CN/H ₂ O (45/55 v/v)	-	-	DAD (245 nm)
lidská plasma a moč	testosteron a jiné [30]	Inertsil C ₈ (250 mm × 4 mm, 5 μm)	0,11% CH ₃ COOH – CH ₃ COONa 7,5 mM, pH 4/ CH ₃ CN/CH ₃ OH (50/45/5 v/v/v)	3,6 (plasma) 1,1 (moč)	10,9 (plasma) 3,5 (moč)	UV (238 nm)
lidská moč	TP, TPh, TI, TD [31]	ODS – ET 250/8/4 Nucleosil 5 C ₈ (250 mm × 4,6 mm)	CH ₃ OH (100/0 v/v)	1,1 (TP) 2,2 (TPh, TI) 3,6 (TD)	-	UV (254 nm)

Pokračování tab. 2

			A: CH ₃ CN/H ₂ O/HCOOH (80/20/2 v/v/v)			
hovězí srst	TP, TPh, TI, TD [32]	Waters Symmetry C ₈ (150 mm × 2,1 mm, 5 mm)	B: CH ₃ CN/H ₂ O (100/2 v/v) (A/B v/v) ¹	-	-	MS/MS
sérum a plasma dobytka	TP, TD [24]	Waters Acquity BEH (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm)	CH ₃ CN /0,1% HCOOH (A/B v/v) ²	-	-	MS/MS

¹ Gradientová eluce: složka A (0-1-15-16-25 min) / (100-20-20-0 %)² Gradientová eluce: složka A (0-2-9-12 min) / (70-70-100-70 %)

Analýzou anabolických steroidů v biologických matricích se v literatuře zabývá velké množství prací. Tyto metody jsou uplatňovány především v antidopingových kontrolách, ale také jsou používány ke sledování chovu hospodářských zvířat, u kterých je přítomnost anabolických steroidů přísně regulována Státní veterinární správou [33]. Dále jsou anabolické steroidy stanovovány v podobě nejrozličnějších lékových forem jako tablety, kapsle nebo injekční roztoky, které jsou běžně k dostání na internetu. I zde hrozí riziko týkající se kvality nabízených produktů, jelikož mnohdy dané farmaceutické přípravky neobsahují látky, které jsou uváděny na obalu, nebo naopak obsahují další jiné látky, které nejsou zmíněny.

Jedna z prací publikovaná v roce 2008 byla zaměřena na analýzu zabavených léčiv vyskytujících se na černém trhu, mezi kterými se objevily i anabolické steroidy [34]. Před analýzou byly roztoky v olejové matrici homogenizovány, rozpuštěny v 10 ml methanolu pomocí ultrazvukové lázně, poté byla provedena centrifugace a následně byl supernatant zředěn s methanolem v poměru 1:9. Takto upravený vzorek byl nastříknut do HPLC systému. Separace probíhala na koloně Zorbax C₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 μm) za použití gradientové eluce. Mobilní fáze obsahovala dvě složky, první složka byl 5mM octan amonný s 0,1% kyselinou octovou a druhá složka obsahovala acetonitril. Program eluce je popsán v tab. 3, kde jsou také uvedena některá další stanovení esterů testosteronu, které jsou aplikovány injekčně.

Tab. 3: Přehled vybraných stanovení esterů testosteronu v injekčních roztocích

Typ vzorku	Analyt	Stacionární fáze - kolona	Mobilní fáze	LOD [ng/ml]	LOQ [ng/ml]	Detekce
Injekční roztok na olejové bázi	TP a jiné [35]	Luna CN (250 mm × 4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ CN/H ₂ O (43/57 v/v)	13	43	DAD (245 nm)
Injekční roztok na olejové bázi	TP, TPh, TI, TD a jiné [36]	Waters μBondapak RP - C ₁₈ (300 mm × 2,0 mm)	CH ₃ CN/H ₂ O (A/B v/v) ³	2 (TP) 1 (TD)	-	UV (243 nm), MS
Injekční roztok na olejové bázi	TP, TPh, TI, TD a jiné [35]	Zorbax XDB – C ₈ (150 mm × 4,6 mm, 5 μm)	CH ₃ CN/5mM CH ₃ COONH ₄ s 0,1% CH ₃ COOH (A/B v/v) ⁴	-	-	MS/MS
Injekční roztok na olejové bázi	TP a jiné [23]	Waters Aquity BEH C ₁₈ (100 mm × 2,1 mm, 1,7 μm)	CH ₃ CN/H ₂ O s 0,1% HCOOH (A/B v/v) ⁵	-	1	MS/MS

³ Gradientová eluce: složka A (0-20-22-29 min) / (60-90-95-60 %)⁴ Gradientová eluce: složka A (0-4-12,6 min) / (25-95-95 %)⁵ Gradientová eluce: složka A (0-3-17-20-24,5 min) / (20-20-100-100-20 %)

2.3 Vysokoúčinná kapalinová chromatografie

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je nejčastějším uspořádáním kapalinové chromatografie, kdy je mobilní fáze přiváděna do systému za vysokého tlaku pomocí čerpadla. Jedná se o separační metodu, která je založena na rozdílné distribuci látek mezi mobilní a stacionární fází. Chromatografie byla objevena rusko-italským botanikem M. S. Cvěttem na začátku 20. století [37]. V dnešní době patří mezi nejvyužívanější analytické metody a je využívána v různých oborech (potravinářský či farmaceutický průmysl, má uplatnění v kosmetice, v životním prostředí aj.) [38].

Kapalinová chromatografie se dělí na chromatografii na normálních fázích (NP) a na obrácených fázích (RP). V systémech s normálními fázemi jsou pro separaci používány polární stacionární fáze a nepolární mobilní fáze. V praxi je dnes ale tento typ ve většině nahrazen chromatografií na obrácených fázích. Mobilní fáze má polární charakter, obvykle se jedná o směsi vodných složek s polárními organickými rozpouštědly (např. acetonitril či methanol), která jsou mísitelná s vodou. Stacionární fáze jsou nepolární, jedná se o dlouhé uhlíkaté řetězce, které jsou navázány na povrch nosiče např. silikagelu. Nejčastěji používanou stacionární fází je C₁₈. Separaci na reverzních fázích lze využít jak pro směsi nízkomolekulárních látek, tak pro složitější směsi jako rostlinné extrakty či biologické vzorky [39].

Přestože HPLC patří k rychlým a účinným separačním technikám, stále u ní dochází k vývoji především za účelem zrychlení analýzy a zvýšení účinnosti systému. Mezi nové směry v kapalinové chromatografii se řadí metoda UHPLC nebo používání monolitických kolon či kolon s povrchově porézními částicemi v klasickém HPLC uspořádání. Poslední zmíněné kolony jsou plněny částicemi s pevným neporézním jádrem a vnějšího porézního silikagelového obalu (z anglického core-shell particles nebo fused-core silica). Celkový průměr částice je nejčastěji 2,7 μm s vnějším obalem o tloušťce 0,5 μm, tyto hodnoty se liší v závislosti na výrobcí. Hlavní výhodou těchto částic je fakt, že analyt nemusí pronikat celou částicí, ale pouze povrchově porézní vrstvou, čímž se zkrátí jeho dráha a dojde k celkovému zrychlení analýzy [40].

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

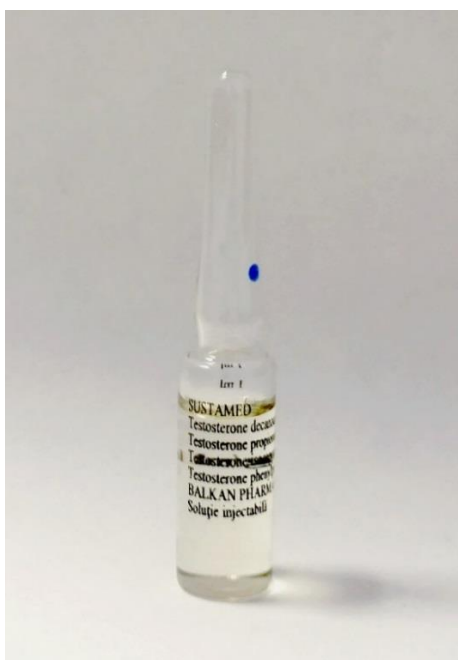
3.1 Chemikálie

- acetonitril (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- isopropanol (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- methanol (čistota $\geq 99,9$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- kyselina octová (čistota $\geq 99,8$ %, Lach-Ner, Česká republika)
- octan amonný (čistota ≥ 98 %, Sigma – Aldrich, Německo)
- deionizovaná voda získaná purifikací přístrojem Milli-Q (Millipore, Bedford, USA)
- testosteron propionát (čistota $\geq 99,3$ %, Marvel Pharma Inc., Čína)
- testosteron fenylpropionát (čistota $\geq 99,4$ %, Marvel Pharma Inc., Čína)
- testosteron isokaproát (čistota $\geq 99,5$ %, Marvel Pharma Inc., Čína)
- testosteron dekanoát (čistota $\geq 98,7$ %, Marvel Pharma Inc., Čína)
- benzylalkohol (čistota $\geq 99,8$ %, Sigma – Aldrich, Německo)
- benzylbenzoát (čistota $\geq 99,0$ %, Sigma – Aldrich, Německo)

Analyzovaný vzorek byl farmaceutický přípravek Sustamed od firmy Balkan Pharmaceuticals, Moldavsko (obr. 6). Balení Sustamedu obsahovalo 10 skleněných ampulek o objemu 1 ml (obr. 7). V každé ampulce byl lehce nažloutlý olejový roztok čtyř esterů testosteronu o celkové koncentraci 250 mg/ml (30 mg/ml testosteron propionátu, 60 mg/ml testosteron fenylpropionátu, 60 mg/ml testosteron isokaproátu a 100 mg/ml testosteron dekanoátu). Ampulka dále obsahovala také benzyl alkohol a benzylbenzoát, které sloužily jako konzervační látky. Jako nosič byl použit broskvový olej.



Obr. 6: Originální obal analyzovaného farmaceutického přípravku Sustamed.



Obr. 7: Detail skleněné 1ml ampulky analyzovaného vzorku Sustamed.

3.2 Přístroje

- kapalinový chromatograf Agilent Technologies 1260 Infinity s detektorem diodového pole Agilent 1260 Infinity Diode Array Detector VL (G1315D), (Agilent Technologies, USA)
- kolona Poroshell HPH-C18 (3,0 × 100 mm, velikost částic 2,7 µm), (Agilent Technologies, USA)
- analytické váhy APX-100 (Denver Instrument, Německo)
- ultrazvuk Ultrasonic LC30H (Elma, Německo)
- pH-metr 3540 (Jenway, Velká Británie)
- injekční stříkačka Hamilton o objemu 100 µl (Bonaduz, Švýcarsko)
- teflonové filtry Rotilabo® 0,45 µm (Carl Roth GmbH+Co., Německo)

3.3 Programy

- sbírání dat v programu Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition verze C.01.06 (Agilent Technologies, USA)
- zpracování dat v programu Agilent OpenLAB CDS ChemStation Edition verze C.01.06 (Agilent Technologies, USA), Microsoft Excel 2013 (Microsoft Co., USA)

3.4 Příprava vzorků

Byl hledán vhodný solvent, který by kvantitativně rozpustil jednak stanovované látky a současně i olejovou matici farmaceutického přípravku Sustamed. Byly testovány následující solventy: isopropanol, methanol a 80% methanol.

1. Z ampulky farmaceutického přípravku Sustamed bylo odebráno 50 µl roztoku pomocí injekční stříkačky Hamilton. Roztok byl převeden do 5ml odměrné baňky a doplněn po rysku isopropanolem.
2. Z ampulky farmaceutického přípravku Sustamed bylo odebráno 50 µl roztoku pomocí injekční stříkačky Hamilton. Roztok byl převeden do 5ml odměrné baňky, k roztoku bylo přidáno 1450 µl isopropanolu a následně byla baňka doplněna po rysku methanolem.
3. Z ampulky farmaceutického přípravku Sustamed bylo odebráno 50 µl roztoku pomocí injekční stříkačky Hamilton. Roztok byl převeden do 5ml odměrné baňky,

k roztoku bylo přidáno 1450 μ l isopropanolu a následně byla baňka doplněna po rysku 80% methanolem.

Všechny odměrné baňky byly vloženy na 15 minut do ultrazvukové lázně z důvodu snadnějšího rozpouštění a jednotlivé roztoky byly následně přefiltrovány. Každá příprava byla provedena dvakrát.

3.5 Příprava kalibračních roztoků

Bylo připraveno 7 kalibračních roztoků tak, aby jejich koncentrační rozmezí bylo od 20 % po 140 %, přičemž 100 % odpovídalo koncentracím esterů testosteronu ve farmaceutickém přípravku Sustamed. Poté byly kalibrační roztoky 100 \times zředěny.

Testosteron propionát byl připraven v koncentracích 0,06 mg/ml, 0,12 mg/ml, 0,18 mg/ml, 0,24 mg/ml, 0,30 mg/ml, 0,36 mg/ml a 0,42 mg/ml. Testosteron fenylpropionát a testosteron isokaproát byly připraveny v koncentracích 0,12 mg/ml, 0,24 mg/ml, 0,36 mg/ml, 0,48 mg/ml, 0,60 mg/ml, 0,72 mg/ml a 0,84 mg/ml. Testosteron dekanoát byl připraven v koncentracích 0,2 mg/ml, 0,4 mg/ml, 0,6 mg/ml, 0,8 mg/ml, 1 mg/ml, 1,2 mg/ml a 1,4 mg/ml.

Do 50ml odměrných baněk byla navážena příslušná množství standardů esterů testosteronu a baňky byly následně doplněny methanolem po rysku. Poté byly odměrné baňky vloženy na 15 minut do ultrazvukové lázně a nakonec byly jednotlivé roztoky přefiltrovány.

3.6 Příprava pufru

Příprava 10mmol/l roztoku octanu amonného byla provedena navážením 0,77 g octanu amonného, který byl následně rozpuštěn v 1 l deionizované vody. Přidavky ledové kyseliny octové a pomocí pH-metru bylo pH upraveno na hodnotu 4,5.

3.7 Optimalizace separace esterů testosteronu

Bylo optimalizováno složení mobilní fáze vhodné pro separaci esterů testosteronu. Byla testována mobilní fáze obsahující acetonitril jako organický modifikátor s vodnou složkou v různém poměru. Jako vodná složka byl použit 10mmol/l octan amonný o pH 4,5. Všechny analýzy byly provedeny při průtoku mobilní fáze 1 ml/min za podmínek isokratické i gradientové eluce. Teplota kolony byla

za podmínek isokratické eluce nastavena na 30 °C a během gradientové eluce na 50 °C. Objem nástřiku byl 1 µl.

3.8 Mez detekce a mez stanovitelnosti

Mez detekce (LOD) a mez stanovitelnosti (LOQ) byly počítány podle následujících vztahů:

$$LOD = 3 \cdot h_n / m \quad (3.1)$$

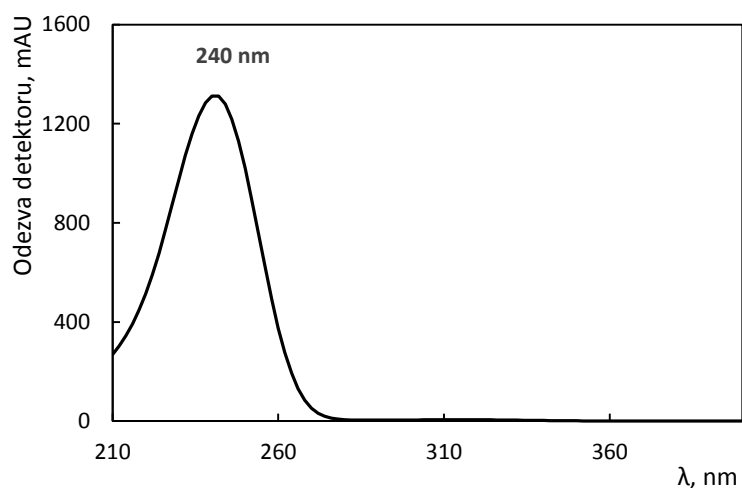
$$LOQ = 10 \cdot h_n / m, \quad (3.2)$$

kde h_n vyjadřuje šum základní linie a m směrnici kalibrační přímky závislosti výšky píku na koncentraci analytu. Šum základní linie byl určen jako 0,033 mAU.

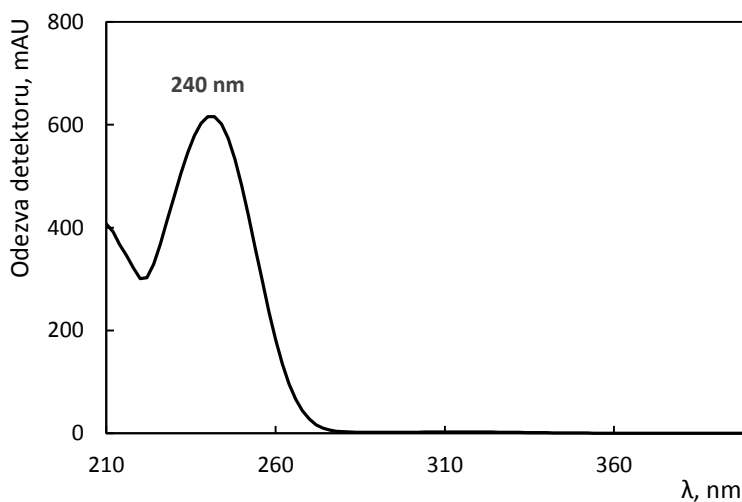
4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Optimalizace separačních podmínek

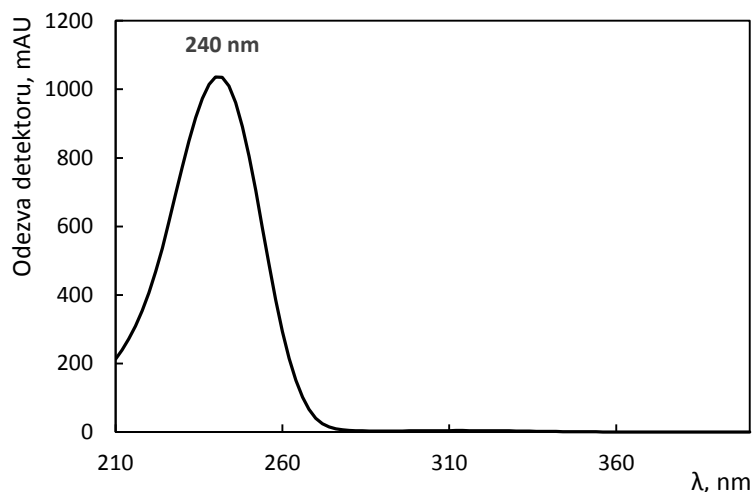
Pro detekci vzorků byla zvolena vlnová délka 240 nm, protože odpovídala vlnové délce absorpčního maxima všech analyzovaných látek. Záznamy absorpčních spekter daných analytů jsou uvedena na obr. 8 až obr. 11.



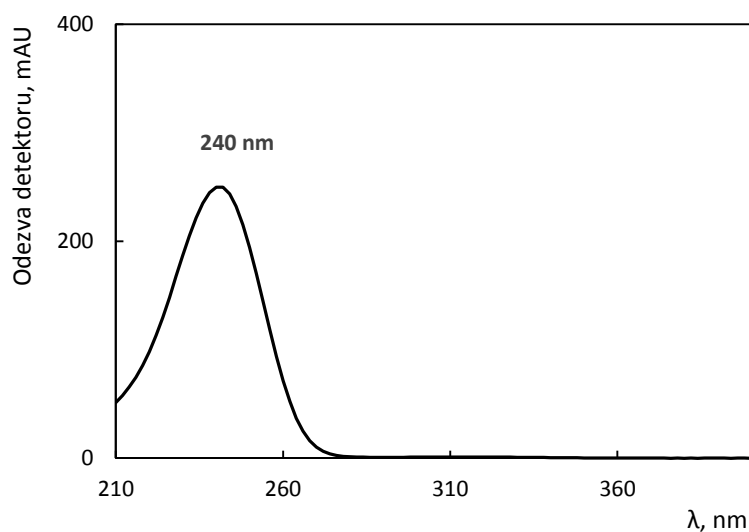
Obr. 8: Spektrum testosteron propionátu v UV/VIS oblasti.



Obr. 9: Spektrum testosteron fenypropionátu v UV/VIS oblasti.



Obr. 10: Spektrum testosteron isokaproátu v UV/VIS oblasti.



Obr. 11: Spektrum testosteron dekanoátu v UV/VIS oblasti.

Nejprve byla použita mobilní fáze acetonitril – voda v různých objemových poměrech. Byl sledován vliv poměru organické a vodné složky na různé chromatografické charakteristiky jako retenční faktor, faktor asymetrie píku, počet teoretických pater a rozlišení píků. Měření byla provedena v tripletech a následně zprůměrována. Tyto údaje jsou uvedeny v tab. 4.

Tab. 4: Vliv organické a vodné fáze na separaci analytů. Mrtvý čas kolony je 0,39 min. (SD je směrodatná odchylka.)

Analyt	CH ₃ CN/H ₂ O (obj. %)	<i>k</i> (SD)	<i>T</i> (SD)	<i>N</i> (SD)	<i>R_{i,j}</i> (SD)
testosteron	70/30	3,4 (0,0)	0,88 (0,01)	35393 (85)	
propionát	75/25	2,5 (0,0)	0,88 (0,01)	28742 (2240)	
	80/20	1,9 (0,0)	0,88 (0,00)	24574 (36)	
	85/15	1,4 (0,0)	0,87 (0,01)	19385 (20)	
	90/10	1,1 (0,0)	0,87 (0,00)	15484 (50)	
	95/5	0,8 (0,0)	0,88 (0,00)	13487 (510)	
testosteron	70/30	7,1 (0,0)	0,90 (0,00)	47695 (93)	30,8 (0,1)
fenylpropionát	75/25	4,8 (0,0)	0,90 (0,01)	39542 (2321)	23,2 (0,8)
	80/20	3,3 (0,0)	0,88 (0,00)	34560 (85)	17,4 (0,0)
	85/15	2,3 (0,0)	0,88 (0,00)	27312 (20)	11,8 (0,0)
	90/10	1,6 (0,0)	0,88 (0,01)	21233 (243)	7,3 (0,0)
	95/5	1,1 (0,0)	0,87 (0,00)	15867 (592)	4,1 (0,0)
testosteron	70/30	10,4 (0,0)	0,90 (0,00)	52773 (532)	19,4 (0,0)
isokaproát	75/25	7,1 (0,0)	0,90 (0,01)	46948 (3052)	17,4 (0,6)
	80/20	4,9 (0,0)	0,88 (0,01)	43055 (191)	15,7 (0,0)
	85/15	3,4 (0,0)	0,88 (0,00)	36086 (94)	13,1 (0,0)
	90/10	2,3 (0,0)	0,86 (0,01)	28662 (876)	10,4 (0,1)
	95/5	1,6 (0,0)	0,86 (0,00)	21812 (20)	7,5 (0,1)
testosteron	70/30	59,0 (0,2)	0,89 (0,00)	61484 (485)	83,2 (0,4)
dekanoát	75/25	36,1 (0,1)	0,90 (0,01)	55101 (3595)	74,3 (2,5)
	80/20	22,5 (0,0)	0,88 (0,00)	56350 (658)	69,0 (0,3)
	85/15	13,9 (0,0)	0,87 (0,00)	55111 (146)	60,6 (0,0)
	90/10	8,3 (0,0)	0,86 (0,01)	50353 (370)	48,9 (0,2)
	95/5	4,8 (0,0)	0,87 (0,01)	42774 (138)	35,4 (0,1)

Výše uvedené hodnoty v tabulce byly vypočteny podle následujících vztahů:

$$k_i = (t_{R,i} - t_M)/t_M \quad (4.1)$$

kde k_i je retenční faktor, $t_{R,i}$ je retenční čas daného analytu a t_M je mrtvý čas kolony.

$$T = w_{0,05}/2f \quad (4.2)$$

kde T je tailling faktor, $w_{0,05}$ je šířka píku v 5 % jeho výšky a f je šířka vzestupné části píku v 5 % jeho výšky.

$$N = 16 \cdot (t_{R,i}/w_i)^2 \quad (4.3)$$

kde N je počet teoretických pater dané kolony, $t_{R,i}$ je retenční čas daného analytu a w_i je šířka píku při základně.

$$R_{i,j} = 2 \cdot (t_{R,i} - t_{R,j})/(w_i + w_j) \quad (4.4)$$

Kde $R_{i,j}$ rozlišení dvou píků, $t_{R,i}$ a $t_{R,j}$ jsou retenční časy analytů a w_i a w_j jsou šířky píků při základně.

Podle tab. 4 je zřejmé, že analyty nejrychleji eluovaly při větším objemovém zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi. Nejnižších hodnot retenčního faktoru bylo dosaženo při 95 obj. %, se snižováním poměru organické složky v mobilní fázi se retenční faktor zvyšoval. Snižováním zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi docházelo ke zvýšení účinnosti separace a k vyššímu rozlišení píků. Tailling faktor vypovídající o symetrii píku se během různých poměrových zastoupení významně nelišil.

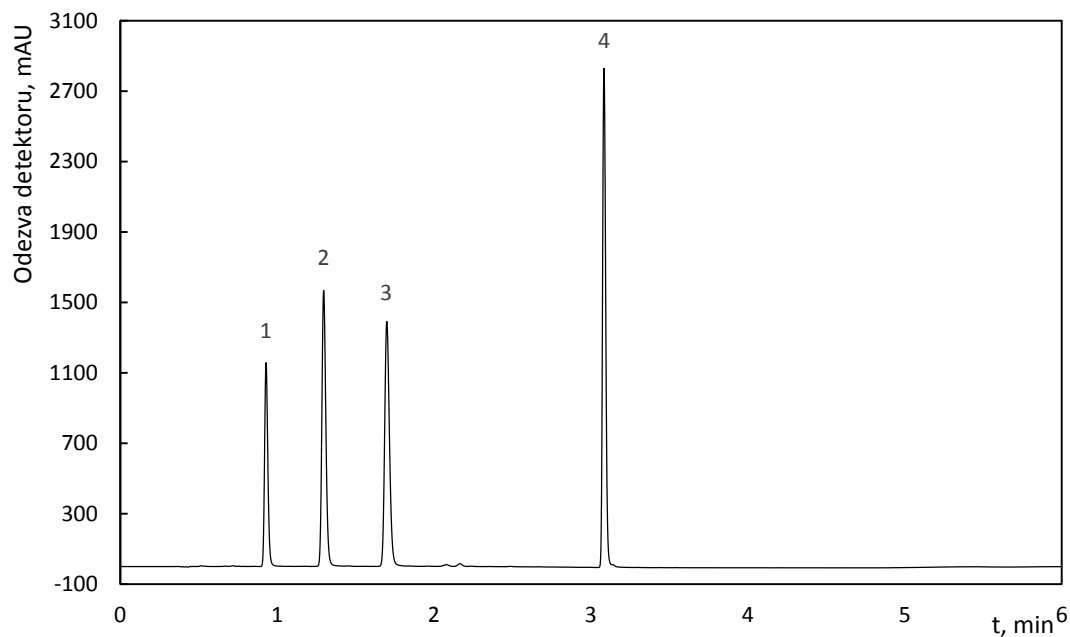
Pro zlepšení a zrychlení separace analytů byly testovány podmínky gradientové eluce. Jako vodná složka mobilní fáze byl použit 10mmol/l octan amonný o pH 4,5. Ke zrychlení separace a zlepšení tvaru píku byla teplota kolony nastavena na 50 °C. Bylo testováno několik různých gradientových programů. Optimální gradient, který byl použit pro analýzu směsi standardů a následně analýzu farmaceutického přípravku Sustamed, je uveden v tab. 5.

Tab. 5: Optimální gradient použitý pro analýzu. Složka A je acetonitril, složka B je 10mmol/l octan amonný o pH 4,5.

Čas (min)	A (obj. %)	B (obj. %)
0	80	20
0,5	80	20
1,5	100	0
3,5	100	0
4	80	20
6	80	20

Použitím gradientové eluce se podařilo rozdělit všechny čtyři analyty na základní linii, přičemž celková doba analýzy společně s ekvilibrací kolony nepřesáhla 6 minut.

Na obr. 12 je chromatografický záznam analýzy směsi standardů za optimálních separačních podmínek.



Obr. 12: Chromatogram směsi standardů za optimalizovaných separačních podmínek: složení mobilní fáze acetonitril/10mmol/l octan amonný o pH 4,5, gradientová eluce, průtok 1 ml/min, teplota kolony 50 °C, objem nástriku 1 μ l a UV detekce při 240 nm. Pořadí eluentů: testosteron propionát (1), testosteron fenypropionát (2), testosteron isokaproát (3), testosteron dekanoát (4).

4.2 Kalibrační závislosti, mez detekce a mez stanovení

Výsledky regresní analýzy pro závislost výšky píku na koncentraci analytů jsou uvedeny v tab. 6 a pro závislost plochy píku na koncentraci analytu jsou uvedeny v tab. 7.

Tab. 6: Výsledky regresní analýzy vyhodnocené z výšek píku. (R^2 – koeficient determinace, LOD – mez detekce, LOQ – mez stanovitelnosti a SD – směrodatná odchylka)

Analyt	Směrnice (SD) [ml/mg · mAU]	Úsek (SD) [mAU]	R^2	Lineární dynamický rozsah [µg/ml]	LOD [µg/ml]	LOQ [µg/ml]
TP	3912 (38)	3,56 (5,03)	0,9998	60 – 420	0,025	0,084
TPh	2544 (5)	20,15 (11,14)	0,9997	120 – 840	0,039	0,130
TI	2272 (20)	23,17 (11,38)	0,9997	120 – 840	0,044	0,145
TD	2805 (6)	203,67 (15,85)	0,9910	200 – 1000	0,035	0,118

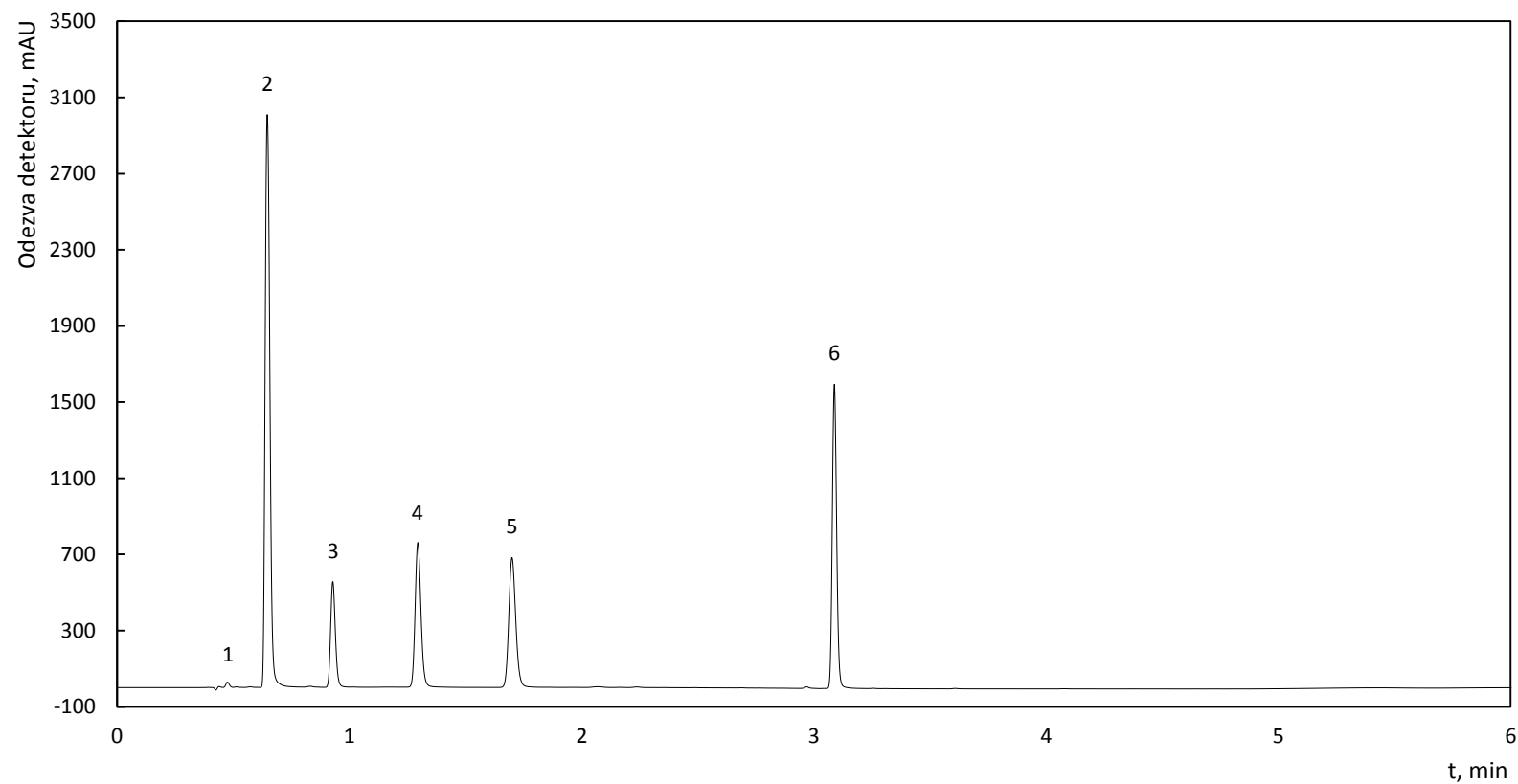
Tab. 7: Výsledky regresní analýzy vyhodnocené z ploch píku. (R^2 – koeficient determinace a SD – směrodatná odchylka)

Analyt	Směrnice (SD) [ml/mg · mAU]	Úsek (SD) [mAU]	R^2	Lineární dynamický rozsah [µg/ml]
TP	5532 (63)	1,42 (7,33)	0,9997	60 – 420
TPh	4469 (16)	15,19 (15,30)	0,9999	120 – 840
TI	4820 (30)	17,07 (14,23)	1	120 – 840
TD	3757 (25)	233,49 (28,16)	0,9946	200 – 1200

4.3 Stanovení anabolických steroidů v přípravku Sustamed

V analyzovaném přípravku Sustamed, podle příbalového letáku, jsou mimo sledovaných anabolických steroidů přítomny i dvě konzervační látky – benzylalkohol a benzybenzoát. Proto bylo nutné zjistit, zda tyto dvě látky nekoeluují se sledovanými analyty.

Na základě shody retenčních časů a UV spekter bylo zjištěno, že benzylalkohol i benzybenzoát eluují dříve než stanovované analyty. Jedná se o první dva píky zobrazené v chromatogramu analyzovaného farmaceutického přípravku Sustamed, který je uveden na obr. 13.

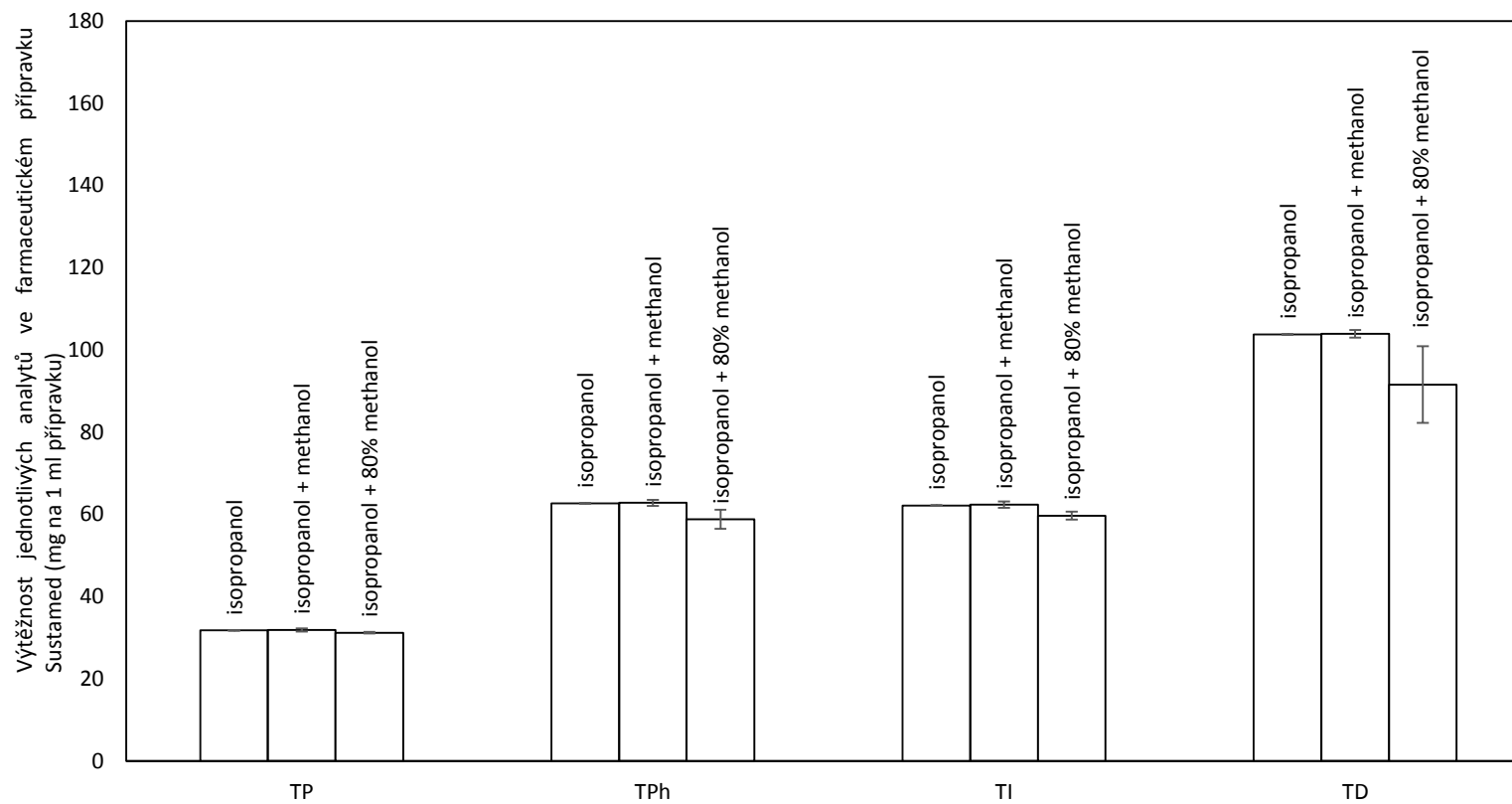


Obr. 13: Chromatogram farmaceutického přípravku Sustamed za optimalizovaných separačních podmínek: složení mobilní fáze acetonitril/10mmol/l octan amonný o pH 4,5, gradientová eluce, průtok 1 ml/min, teplota kolony 50 °C, objem nástřiku 1 μ l a vlnová délka 240 nm. Pořadí eluentů: benzylalkohol (1), benzylbenozoát (2), testosteron propionát (3), testosteron fenylpropionát (4), testosteron isokaproát (5), testosteron dekanoát (6).

Na obr. 14 je uvedeno porovnání výtěžnosti jednotlivých anabolických steroidů, které obsahuje analyzovaný přípravek Sustamed. Před analýzou byly vzorky kvantitativně rozpuštěny ve třech různých solventech. Byly vybrány následující solventy – isopropanol, směs isopropanolu a methanolu a směs isopropanolu s 80% methanolem. Byla testována výtěžnost extrakce a opakovatelnost měření. Jednotlivé záznamy z chromatogramů byly dosazeny do kalibrační závislosti a následně byly vypočteny hodnoty koncentrací jednotlivých analytů.

Každá příprava byla provedena dvakrát, měřena v tripletech, přičemž do grafu byla použita průměrná hodnota společně se směrodatnou odchylkou. Z obr. 14 je vidět, že bylo dosaženo nižší výtěžnosti pro testosteron dekanoát, což mohlo být způsobeno překročením rozpustnosti daného analytu ve směsi isopropanolu a 80% methanolu.

Nejnižší odchylky v přípravě vzorku a dostatečné výtěžnosti bylo dosaženo při použití isopropanolu jako extrakčního činidla. Výsledné hodnoty koncentrací byly: $31,77 \pm 0,05$ mg/ml pro TP, $62,63 \pm 0,00$ mg/ml pro TPh, $62,15 \pm 0,06$ mg/ml pro TI a $103,75 \pm 0,02$ mg/ml pro TD. Nalezené hodnoty koncentrací spadají do specifikačních limitů Evropské lékové agentury (EMA). Podle této specifikace nesmí maximální přípustná odchylka pro množství účinné látky ve farmaceutickém přípravku překročit hodnotu $\pm 5 \%$ [41].



Obr. 14: Porovnání výtěžnosti jednotlivých analytů. Pořadí: testosteron propionát (TP), testosteron fenylpropionát (TPh), testosteron isopropionát (TI) a testosteron dekanoát (TD).

5 ZÁVĚR

Byla vyvinuta rychlá metoda vysokoúčinné kapalinové chromatografie s detekcí diodového pole ke stanovení čtyř sledovaných anabolických steroidů – testosteron propionátu, testosteron fenylpropionátu, testosteron isokaproátu a testosteron dekanoátu – které jsou obsaženy ve farmaceutickém přípravku Sustamed moldavské firmy Balkan Pharmaceuticals. Jako optimální separační podmínky byly zvoleny následující parametry: kolona Poroshell HPH-C18 s povrchově porézními částicemi o velikosti 2,7 μm , mobilní fáze acetonitril/10mM octan amonný, pH = 4,5, průtok mobilní fáze 1 ml/min za gradientové eluce, teplota kolony 50 °C. Pro UV detekci byla po proměření spekter všech sledovaných esterů testosteronu vybrána vlnová délka 240 nm, která odpovídá absorpčnímu maximu daných analytů. Celková doba analýzy nepřesáhla 6 minut.

Byla provedena kalibrace v rozmezí 20 – 140 % koncentrace stanovovaných analytů odpovídající množství analytů v přípravku Sustamed. Byly vypočteny meze detekce a meze stanovitelnosti. Vypočtená hodnota meze detekce byla 0,025 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron propionát, 0,039 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron fenylpropionát, 0,044 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron isokaproát a 0,035 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron dekanoát. Vypočtená hodnota meze stanovitelnosti byla 0,084 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron propionát, 0,130 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron fenylpropionát, 0,145 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron isokaproát a 0,118 $\mu\text{g/ml}$ pro testosteron dekanoát.

V analyzovaném farmaceutickém přípravku Sustamed byly stanoveny koncentrace jednotlivých anabolických steroidů. Výsledné hodnoty koncentrací byly: $31,77 \pm 0,05$ mg/ml pro testosteron propionát, $62,63 \pm 0,00$ mg/ml pro testosteron fenylpropionát, $62,15 \pm 0,06$ mg/ml pro testosteron isokaproát a $103,75 \pm 0,02$ mg/ml pro testosteron dekanoát. Tyto hodnoty spadají do specifikačních limitů Evropské lékové agentury (EMA). Podle této specifikace nesmí maximální přípustná odchylka pro množství účinné látky ve farmaceutickém přípravku překročit hodnotu $\pm 5 \%$.

6 POUŽITÁ LITERATURA

- [1] FOJTÍKOVÁ, Lucie, Sandra GÖSELOVÁ a Barbora HOLUBOVÁ. ANABOLICKÉ ANDROGENNÍ STEROIDY – NEBEZPEČÍ V DOPLŇCÍCH STRAVY. *Chemické listy*. 2015, roč. 109, s. 913–917. ISSN 1213-7103.
- [2] EVANS, Nick A. Current Concepts in Anabolic-Androgenic Steroids. *The American Journal of Sports Medicine* [online]. 2004, roč. 32, č. 2, s. 534–542. ISSN 0363-5465, 1552-3365. Dostupné z: doi:10.1177/0363546503262202
- [3] JIŘÍ, Vlček, Vytřisalová MAGDA a KOLEKTIV. *Klinická farmacie II*. B.m.: Grada Publishing, a.s., 2014. ISBN 978-80-247-4532-9.
- [4] LENEHAN, Pat. *Anabolic steroids and other performance-enhancing drugs* [online]. 2003 [vid. 2016-březen-08]. ISBN 978-0-203-63453-0. Dostupné z: <http://www.crcnetbase.com/isbn/9780203634530>
- [5] TAYLOR, William N. *Anabolic steroids and the athlete*. 2nd ed. Jefferson, N.C: McFarland, 2002. ISBN 978-0-7864-1128-3.
- [6] STERNGASS, Jon. *Steroids*. New York: Marshall Cavendish Benchmark, 2011. ISBN 978-0-7614-4903-4.
- [7] *Anabolic Steroids / CESAR* [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <http://www.cesar.umd.edu/cesar/drugs/steroids.asp>
- [8] *Drug Fact Sheet* [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: http://www.dea.gov/druginfo/drug_data_sheets/Steroids.pdf
- [9] BARCELOUX, Donald G. *Medical Toxicology of Drug Abuse: Synthesized Chemicals and Psychoactive Plants*. B.m.: John Wiley & Sons, 2012. ISBN 978-1-118-10605-1.
- [10] *Steroid Effects / Short Term, Long Term & Side Effects* [online]. [vid. 2016-březen-17]. Dostupné z: <http://drugabuse.com/library/the-effects-of-steroid-use/>
- [11] SILBERNAGL, Stefan, Agamemnon DESPOPOULOS, Rüdiger GAY a Astried ROTHENBURGER. *Atlas fyziologie člověka*. Praha: Grada, 2004. ISBN 978-80-247-0630-6.
- [12] KOOLMAN, Jan a Klaus-Heinrich RÖHM. *Barevný atlas biochemie*. Praha: Grada, 2012. ISBN 978-80-247-2977-0.
- [13] CAS 58-22-0, 4-ANDROSTEN-17 β -OL-3-ONE [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <https://steraloids.com/4-androsten-17-ol-3-one-234.html>
- [14] LEMKE, Thomas L. a David A. WILLIAMS. *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. B.m.: Lippincott Williams & Wilkins, 2012. ISBN 978-1-60913-345-0.

- [15] CAS 57.85.2, 4-ANDROSTEN-17 β -OL-3-ONE PROPIONATE [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <https://steraloids.com/androst-based/4-androsten-17-ol-3-one-propionate-228.html>
- [16] CAS 62-90-8, 4-ESTREN-17 β -OL-3-ONE PHENYLPROPIONATE [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <https://steraloids.com/4-estren-17-ol-3-one-phenylpropionate.html>
- [17] CAS 15262-86-9, 4-ANDROSTEN-17 β -OL-3-ONE ISOCAPROATE. [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <https://steraloids.com/4-androsten-17-ol-3-one-isocaproate.html>
- [18] CAS 5721-91-5, 4-ANDROSTEN-17 β -OL-3-ONE DECANOATE [online]. [vid. 2016-březen-07]. Dostupné z: <https://steraloids.com/androst-based/4-androsten/4-androsten-17-ol-3-one-decanoate.html>
- [19] *tp / C22H32O3 / ChemSpider* [online]. [vid. 2016-březen-09]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.5774.html?rid=accdca3a-f2ec-40c7-ac3d-3007735b6b52>
- [20] *Testosterone phenylpropionate / C28H36O3 / ChemSpider* [online]. [vid. 2016-březen-09]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.14062.html?rid=91706d8a-ba70-41be-9c83-3c2d484cdd56>
- [21] *Testosterone isocaproate / C25H38O3 / ChemSpider* [online]. [vid. 2016-březen-09]. Dostupné z: http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.23089246.html?rid=f1ddd9c1-e702-4958-bc7a-4a8424683e3e&page_num=0
- [22] *Testosterone decanoate / C29H46O3 / ChemSpider* [online]. [vid. 2016-březen-09]. Dostupné z: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.136680.html?rid=a7c07a96-ddf7-4aeb-9083-1cce63a76d1b>
- [23] CHO, So-Hyun, Hyoung Joon PARK, Ji Hyun LEE, Jung-Ah DO, Seok HEO, Jeong Hwa JO a Sooyeul CHO. Determination of anabolic-androgenic steroid adulterants in counterfeit drugs by UHPLC-MS/MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2015, roč. 111, s. 138–146. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2015.03.018
- [24] KAABIA, Z., G. DERVILLY-PINEL, F. HANGANU, N. CESBRON, E. BICHON, M.A. POPOT, Y. BONNAIRE a B. LE BIZEC. Ultra high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry based identification of steroid esters in serum and plasma: An efficient strategy to detect natural steroids abuse in breeding and racing animals. *Journal of Chromatography A* [online]. 2013, roč. 1284, s. 126–140. ISSN 00219673. Dostupné z: doi:10.1016/j.chroma.2013.02.010
- [25] MUSHARRAF, Syed G a Umair GULZAR. Effective separation and simultaneous analysis of anabolic androgenic steroids (AAS) in their

pharmaceutical formulations by a validated TLC-densitometry method. *Chemistry Central Journal* [online]. 2012, roč. 6, č. 1, s. 54. ISSN 1752-153X. Dostupné z: doi:10.1186/1752-153X-6-54

- [26] BOYER, S., P. GARCIA, M. A. POPOT, V. STEINER a M. LESIEUR. Detection of testosterone propionate administration in horse hair samples. *Journal of Chromatography B* [online]. 2007, roč. 852, č. 1–2, s. 684–688. ISSN 1570-0232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2007.02.046
- [27] LOI, V., M. VERTZONI, A. VRYONIDOU a C. PHENEKOS. Development and validation of a simple reversed-phase high-performance liquid chromatography method for the determination of testosterone in serum of males. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2006, roč. 41, č. 2, s. 527–532. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2005.11.021
- [28] SAITO, Keita, Katsuharu YAGI, Atsushi ISHIZAKI a Hiroyuki KATAOKA. Determination of anabolic steroids in human urine by automated in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2010, roč. 52, č. 5, s. 727–733. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2010.02.027
- [29] GONZALO-LUMBRERAS, R. a R. IZQUIERDO-HORNILLOS. High-performance liquid chromatographic optimization study for the separation of natural and synthetic anabolic steroids. Application to urine and pharmaceutical samples. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* [online]. 2000, roč. 742, č. 1, s. 1–11. ISSN 03784347. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-4347(00)00026-8
- [30] SAMANIDOU, V. F., E. G. KARAGEORGOU a I. N. PAPADOYANNIS. Development of a Validated HPLC Method for the Simultaneous Determination of Anabolic Steroids in Biological Fluids. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* [online]. 2009, roč. 32, č. 8, s. 1107–1126. ISSN 1082-6076, 1520-572X. Dostupné z: doi:10.1080/10826070902841737
- [31] *SIMPLE, EFFICIENT AND SIMULTANEOUS DETERMINATION OF ANABOLIC STEROIDS IN HUMAN URINE* [online]. [vid. 2016-březen-08]. Dostupné z: http://www.jpma.org.pk/full_article_text.php?article_id=5128
- [32] NIELEN, M, J LASAROMS, P MULDER, J VANHENDE, J VANRHIJN a M GROOT. Multi residue screening of intact testosterone esters and boldenone undecylenate in bovine hair using liquid chromatography electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* [online]. 2006, roč. 830, č. 1, s. 126–134. ISSN 15700232. Dostupné z: doi:10.1016/j.jchromb.2005.10.028
- [33] *Předpis č. 291/2003 Sb. - Vyhláška o zákazu podávání některých látek zvířatům, jejichž produkty jsou určeny k výživě lidí, a o... - Aktuální znění* [online]. [vid. 2016-březen-18]. Dostupné z: <http://www.zakonyprolidi.cz/cs/2003-291>

- [34] THEVIS, M., Y. SCHRADER, A. THOMAS, G. SIGMUND, H. GEYER a W. SCHANZER. Analysis of Confiscated Black Market Drugs Using Chromatographic and Mass Spectrometric Approaches. *Journal of Analytical Toxicology* [online]. 2008, roč. 32, č. 3, s. 232–240. ISSN 0146-4760, 1945-2403. Dostupné z: doi:10.1093/jat/32.3.232
- [35] GONZALO-LUMBRERAS, R., M.A. GARCÍA-MIGUENS a R. IZQUIERDO-HORNILLOS. HPLC method development for testosterone propionate and cipationate in oil-based injectables. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* [online]. 2005, roč. 38, č. 4, s. 757–762. ISSN 07317085. Dostupné z: doi:10.1016/j.jpba.2005.02.003
- [36] MESMER, M. Z. a R. D. SATZGER. Determination of Anabolic Steroids by HPLC with UV--Vis--Particle Beam Mass Spectrometry. *Journal of Chromatographic Science* [online]. 1997, roč. 35, č. 1, s. 38–42. ISSN 0021-9665, 1945-239X. Dostupné z: doi:10.1093/chromsci/35.1.38
- [37] KAZAKEVICH, Yuri, Rosario LOBRUTTO a WILEY INTERSCIENCE (ONLINE SERVICE). *HPLC for pharmaceutical scientists* [online]. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 2007 [vid. 2016-březen-08]. ISBN 978-0-470-08795-4. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1002/0470087951>
- [38] *HPLC - High Performance Liquid Chromatography Beginner's Guide : Waters* [online]. [vid. 2016-březen-08]. Dostupné z: http://www.waters.com/waters/en_CZ/HPLC---High_Performance-Liquid-Chromatography-Beginner%27s-Guide/nav.htm?locale=en_CZ&cid=10048919
- [39] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. Praha [i.e. Hradec Králové]; [Klatovy]: Lucie Nováková ; Michal Douša, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.
- [40] OLŠOVSKÁ, J. a M. JURKOVÁ. Nové trendy v kapalinové chromatografii a jejich využití v analýze piva a pivovarských surovin. Část 1. Teoretický úvod. *Kvasný průmysl: odborný časopis pro výrobu nápojů a biochemické technologie*. 2012, roč. 58, č. 2, s. 30–35. ISSN 0023-5830.
- [41] *Specifications and Control Tests on the Finished Product* [online]. [vid. 2016-květen-08]. Dostupné z: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003368.pdf